

DOI 10.29254/2077-4214-2020-1-155-321-328

УДК 616-006:632.95.024:59.08

Лісовська В. С., Недопитанська Н. М., Решавська О. В., Баглий Є. А.

КАНЦЕРОГЕННІСТЬ КАРБЕНДАЗИМУ: ДОСЛІДЖЕННЯ У ХРОНІЧНОМУ ЕКСПЕРИМЕНТІ НА ЩУРАХ W1STAR

ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України» (м. Київ)

lisovskaviktorii@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота виконана в рамках НДР ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України» за темою «Наукове обґрунтування методології державної санітарно-гігієнічної експертизи, її нормативно-правового та інформаційного забезпечення», фрагмент: «Оцінка небезпечності пестицидів і агрохімікатів за критерієм ендокринних порушень», № державної реєстрації 0100U000255.

Вступ. Всесвітня організація з охорони здоров'я констатує постійне зростання захворюваності на рак у всьому світі. Незважаючи на те, що наукові досягнення останніх десятиріч дозволили впровадити більш ефективні методи лікування, стало очевидним, що саме управління відповідними факторами ризику може значно знизити ризик виникнення раку. Йдеться в тому числі про зв'язок з хімічним впливом, про зосередженість на речовинах, що викликають найбільшу занепокоєність [1].

Бензімідазолні фунгіциди, до яких відноситься карбендазим (метил-1Н-бензімідазол-2-іл-карбамат), широко використовуються для боротьби з грибковими захворюваннями рослин. Механізм фунгіцидної дії карбендазиму полягає у взаємодії з β -тубуліном та пригніченні полімеризації мікротрубочок, що призводить до порушення сегрегації хромосом під час поділу клітин, і надалі через припинення поділу призводить до їх загибелі [2,3].

Для карбендазиму експериментально встановлені властивості репродуктивного токсиканта [4-8], негативний вплив на розвиток [5,9] та спричинення дисгормональних порушень [5,7]. Разом з тим, досі нез'ясованим залишається питання канцерогенних властивостей карбендазиму. Відомо, що введення карбендазиму призводить до розвитку пухлин печінки у мишей ліній CD-1 та Swiss [10], тому експерти Агенції з охорони оточуючого середовища (EPA) ще у 1989 році класифікували його як можливий канцероген для людини (група C) [11]. Проте, у Європейському Союзі карбендазим не класифікують як канцероген [4], а виникнення пухлин у мишей вважається видоспецифічним і характерним для окремих ліній.

Результати аналізу канцерогенного потенціалу карбендазиму за електронними параметрами, що відображають взаємодію з ДНК у рамках теорії не-синхронізованого резонансу ковалентного зв'язку, енергії взаємодії канцероген-ДНК, електростатичного тяжіння та проникності клітинної мембрани, доводять його канцерогенний потенціал [11].

Особливої уваги заслуговують дані щодо дуалізму властивості карбендазиму впливати на веретено поділу клітини: з одного боку це обумовлює його фунгіцидну дію, з іншого – інгібує проліферацію пухлинних клітин ссавців, у тому числі в культурі ракових клітин людини [12-14], тобто активно втручається у мітоз як клітин грибів, так і людини. Питання втручання у процес поділу нетрансформованих клітин людини залишається відкритим.

На сьогодні карбендазим заборонений до використання у більшості країн Європейського союзу [15] та США [16], однак продовжує застосовуватись у багатьох інших країнах, у тому числі в Україні. В Україні на основі карбендазиму зареєстровано 27 препаративних форм фунгіцидів, переважно генериків [17], тому дослідження онкогенного потенціалу карбендазиму різних виробників залишається актуальним.

Згідно до вимог IARC та OECD, канцерогенність речовини має бути досліджено на двох видах ссавців (як правило, миші та щури) обох статей в умовах хронічного надходження. Результати нашого експериментального дослідження на мишах показали відсутність ефекту [18].

Мета роботи – дослідження канцерогенності карбендазиму технічного 98 % на щурах Wistar в умовах хронічного експерименту.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведено: ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України» (м. Київ).

Експеримент виконано на 560 статевозрілих щурах Wistar обох статей. Середня маса самців становила 129 ± 22 г, самиць – 118 ± 18 г, початковий вік тварин 1,5-2 місяці. Період акліматизації – 14 днів, після карантину всі щури підлягали ветеринарному огляду, рандомізації, ідентифікації за допомогою індивідуальних міток та розсадці по кліткам. Всі експериментальні тварини утримувались у стандартизованих умовах віварію на збалансованому раціоні.

Щури були розподілені в залежності від дози карбендазиму на 3 піддослідні групи і групу негативного контролю (по 70 самців і 70 самиць), через 12 місяців по 10 тварин кожної статі з кожної групи було умертвлено згідно протоколу дослідження для виявлення можливих передпухлинних станів. Дози карбендазиму підібрані на підставі аналізу попередніх досліджень із вивчення його хронічної токсичності і канцерогенності. Карбендазим вводили тваринам упродовж 24 місяців 5 разів на тиждень внутрішньошлунково за допомогою атравматичного металевого зонду у дозах 5, 25 і 125 мг/кг маси тіла. Тварини

контрольної групи отримували воду в тому ж об'ємі й тим же способом введення, що й піддослідні. Проте, максимальну дозу 125 мг/кг маси тіла було знижено до 75 мг/кг у зв'язку зі зниженням приросту маси тіла самців на 28 % і самиць на 13 % упродовж перших 6 тижнів експозиції.

Щотижнево проводили зважування тварин, щодня здійснювали клінічний огляд, оцінювали поведінку, рухливість, стан шкіри та покривів, слизових оболонок тощо. Для виявлення поверхневих і підшкірних новоутворень проводили пальпацію.

Всі маніпуляції з тваринами виконувались згідно положень «Європейської конвенції про захист тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (ETS №123, Страсбург, 18.03.1986), «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Academies Press, USA, 2011), із дотриманням норм Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» №27, ст. 230, від 2006 р. Комісією з етики медичних та біологічних досліджень «Наукового токсикологічного центру імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України» не виявлено порушень морально-етичних норм під час проведення дослідів із тваринами.

Загиблі впродовж експерименту щури підлягали некропсії. Діагнози виявлених пухлин у щурів за результатами гістологічних досліджень встановлювали відповідно до класифікації пухлин лабораторних тварин, представленої в IARC Scientific Publications [19].

Отримані в експерименті дані оброблені з використанням стандартного ліцензійного пакету програмного забезпечення Microsoft® office Excell 2010, «Statistica, 10.0», згідно вимог до відповідних тест-систем. Застосовувались параметричні і непараметричні методи статистики. Результати представлені у вигляді середнього та стандартного відхилення ($M \pm SD$). Вірогідність відмінностей між показниками оцінювали, використовуючи критерії Стьюдента, χ^2 з поправкою Йейтса, однобічного критерію Фішера; виживаність тварин аналізували за методом Каплана-Мейера, вірогідність розбіжностей між кривими виживаності визначали за допомогою Кокс-Мантел тесту [20-22]. Статистично достовірною вважалась різниця при $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Клінічні обстеження не виявили порушень фізіологічного стану піддослідних щурів порівняно з контрольними упродовж усього терміну експерименту, за виключенням перших 6 тижнів надходження карбендазиму у дозі 125 мг/кг маси тіла, дія якої впливала на приріст маси тіла самців і самиць у середньому на 28 % і 13 %, відповідно. Оскільки при введенні максимально витривалої дози зниження приросту маси тіла тварин не повинно перевищувати 10 %, вищу дозу було знижено до 75 мг/кг маси тіла. В інших експериментальних групах значимих змін маси тіла не встановлено. Тим не менш, аналіз динаміки маси тіла щурів упродовж експерименту показав, що у самців, які отримували карбендазим у дозі 75 мг/кг маси тіла, незначне, проте достовірне зниження маси тіла відмічалось до 43 тижню експерименту ($p \leq 0,05$), наприкінці дослідження маса тіла самців-щурів була зменшена на 6 % ($p \geq 0,05$).

Смертність контрольних щурів упродовж експерименту була дещо вищою порівняно з піддослідни-

ми щурами, крім того, смертність самців була вищою, ніж самиць як піддослідних, так і контрольної групи, особливо впродовж другого року експерименту, і на термінальний строк набувала статистичної значимості (табл. 1).

Таблиця 1 – Показники виживаності щурів упродовж другого року хронічного експерименту (%)

Доза карбендазиму (мг/кг)	Самці			Самиці		
	терміни експозиції (місяці)					
	12	18	24	12	18	24
0	93	55	20	97	83	42
5	93	65	28	100	93	57
25	100	75	30*	100	85	58
75	93	72	32*	97	87	48

Примітка: *статистична достовірність ($p \leq 0,05$) у порівнянні з негативним контролем, Кокс-Мантел тест.

Загибель тварин була обумовлена інтеркурентними захворюваннями, і не пов'язана з введенням карбендазиму.

При некропсії в окремих тварин були відмічені зміни розмірів тимусу, селезінки, печінки, наднирників, щитоподібної залози, а також геморагії у тканині легень, у кількох самиць спостерігалось збільшення матки і/або яєчників. Такі зміни не носили дозо-залежного характеру. Позитивний тренд з дозою простежувався лише за зменшенням розмірів сім'яників: у контрольних тварин зменшення відмічено у 2 тварин, у щурів, які отримували карбендазим у дозі 5 мг/кг маси тіла, зменшення сім'яників було виявлено також у 2 тварин, у дозі 25 мг/кг маси тіла – у 3 щурів, у дозі 75 мг/кг маси тіла – у 6 самців.

При гістоморфологічному дослідженні органів і тканин загиблих та умертвлених згідно протоколу експерименту щурів у частини з них виявлені гемодинамічні зміни у вигляді повнокров'я судин і локальних геморагій у легенях, нирках і печінці; у окремих тварин – повнокров'я судин селезінки, щитоподібної залози, серця і матки. Спостерігались також дистрофічні порушення у паренхімі печінки, рідше – у нефротелії звивистих каналців нирок.

З однаковою частотою як у піддослідних, так і контрольних тварин відмічалась інволюція тимусу (спустошення кори, жирове переродження) і селезінки (зменшення розмірів лімфоїдних фолікулів, потовщення сполучнотканинних балок строми). В сім'яниках щурів діагностовано дегенеративно-деструктивні та атрофічні зміни. Результати виявленої гістопатології непухлинного генезу наведені у **таблиці 2**, з якої видно, що лише частота дегенеративно-атрофічних змін у сім'яниках зростала зі збільшенням дози: у самців, які отримували карбендазим у дозах 25 і 75 мг/кг маси тіла, дегенеративні зміни налічувались у 30 і 44 % тварин, відповідно.

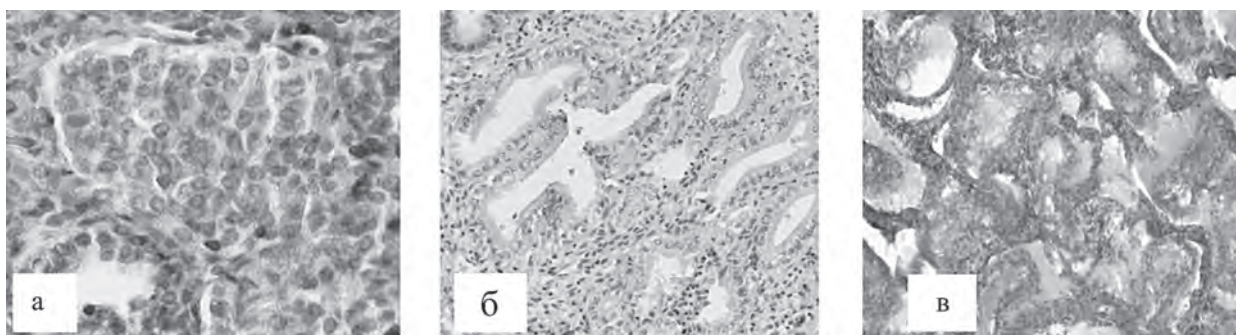
Проліферативні процеси і гіперплазії, які вважаються передпухлинними станами, спостерігали у поодиноких тварин (**див. таблицю 2**): 2 випадки гіперплазії аденогіпофізу; 2 випадки гіперплазії щитоподібної залози (**рис. 1а**) у самців і 9 у самиць, але переважно в контролі; подібна ситуація з гіперплазією парашитоподібної залози. У контрольних самиць і при дії максимальної дози відмічено випадки залоз-

ПАТОМОРФОЛОГІЯ

Таблиця 2 – Непухлинні зміни в органах щурів Wistar при хронічному надходженні карбендазиму

Органи	Гістопатологічні зміни	Доза карбендазиму (мг/кг)								
		самці				самиці				
		0	5	25	75	0	5	25	75	
Гіпофіз	гіперемія	0	2	1	0	1	1	1	0	
	гіперплазія аденогіпофізу	0	1	0	0	0	0	0	1	
Щитоподібна залоза	гіперемія	5	4	5	4	4	5	3	7	
	дегенеративні зміни	5	3	2	12	12	13	7	10	
	склероз	0	0	1	0	1	0	2	0	
	фетальна структура	2	9	7	4	7	3	3	3	
	вузлуватий зоб	0	0	0	0	0	0	1	0	
	гіпертрофія	0	0	0	0	0	0	0	1	
Паращитоподібна залоза	гіперплазія	0	0	1	1	4	1	2	2	
	гіпертрофія	0	1	0	0	0	0	0	0	
Тимус	гіперплазія	0	1	0	0	1	1	0	1	
	інволюція	2	1	4	3	4	4	6	2	
Легені	гіперемія	13	5	9	10	8	7	7	10	
	пневмонія	8	14	10	8	8	4	10	10	
	проліферація епітелію бронхів	0	0	1	2	1	3	1	3	
	осередки пневмосклерозу	0	3	1	2	1	3	0	1	
	абсцес(и)	5	5	7	2	5	1	3	0	
Серце	набряк	0	0	2	0	1	0	3	0	
	зерниста дистрофія міокардиоцитів	4	4	5	4	2	5	4	2	
	атрофія міокардиоцитів	2	1	1	1	0	2	1	0	
	кардіосклероз	0	0	1	1	2	0	1	2	
	гіпертрофія міокардиоцитів	0	0	0	1	2	2	1	0	
	перикардит	1	0	0	0	0	0	0	1	
Печінка	гіперемія	10	3	3	11	5	7	9	11	
	осередковий некроз гепатоцитів	0	2	4	0	3	4	4	1	
	деструктивно-дистрофічні зміни	8	12	13	19	15	16	20	15	
	проліферація жовчних протоків	0	0	0	1	1	0	0	2	
	холангіофіброз	0	1	0	1	3	0	4	0	
	гепатит	1	1	2	0	0	0	0	1	
	екстрамедулярний гемопоез	0	2	0	0	0	1	0	0	
цироз	1	0	0	0	0	0	2	0		
Селезінка <i>біла пульпа</i>	зменшення розмірів і кількості фолікулів	7	1	0	7	10	1	10	7	
	некроз фолікулів	0	4	0	1	2	1	1	1	
	<i>червона пульпа</i>	гіперемія	7	7	10	9	11	14	15	11
		дегенеративні зміни	3	5	4	9	9	8	7	8
		екстрамедулярний гемопоез	0	2	0	0	0	1	0	0
Нирки <i>кора</i> <i>лоханка</i>	гіперемія	16	15	15	16	21	21	23	14	
	деструктивно-дистрофічні зміни	7	17	10	8	17	18	18	10	
	преципітати білку	4	5	7	6	4	5	6	4	
	мікропетрифікати	1	0	0	0	4	5	1	4	
	нефрит	1	1	4	2	5	1	3	5	
	абсцес	0	1	1	1	1	2	1	0	
	полікістоз	2	1	3	6	0	0	2	3	
	папіломатоз	0	0	0	1	0	0	0	0	
	Сечовий міхур	папіломатоз	0	0	0	0	1	0	0	0
		цистит	2	0	0	0	0	0	0	0
Наднирники <i>кора</i> <i>мозкова речовина</i>	гіперемія	4	10	3	3	2	7	10	9	
	кіста геморагічна	0	2	1	1	0	0	2	0	
	стоншення	0	0	9	2	1	0	3	2	
	гіперплазія адренокортикоцитів	1	1	1	2	4	2	3	4	
	повнокрів'я центральної вени	1	7	0	2	3	0	1	0	
Підшлункова залоза <i>екзокринна частина</i>	жирова дистрофія панкреоцитів	0	0	0	0	0	4	3	2	
	осередкові некрози	0	1	1	3	0	1	2	2	
	панкреатит	1	0	0	0	2	1	0	0	
Шлунок	гіперкератоз	0	0	0	1	0	0	0	0	
Сім'яні пухирці	гіперемія	0	1	0	2	-	-	-	-	
	кіста	0	1	0	0	-	-	-	-	
	гіперплазія епітелію	0	1	0	0	-	-	-	-	
Сім'яники	гіперемія	1	2	3	2	-	-	-	-	
	набряк	3	2	0	1	-	-	-	-	
	дегенеративні зміни, атрофія	6	9	21*	31*	-	-	-	-	
	лейдигоклітинна гіперплазія (сегментарна)	0	1	1	3	-	-	-	-	
Матка <i>ендометрій</i>	гіперемія	-	-	-	-	2	2	4	1	
	плоскоклітинна метаплазія	-	-	-	-	0	0	0	2	
	ендометрит	-	-	-	-	2	6	5	1	
	некроз	-	-	-	-	0	2	0	2	
	залозиста гіперплазія	-	-	-	-	3	0	0	4	
Яєчники	папіломатоз	-	-	-	-	0	0	2	1	
	серозна кіста	-	-	-	-	3	9	4	1	
Шкіра	абсцес	-	-	-	-	2	1	0	3	
	гіперкератоз	0	0	0	0	0	0	1	0	

Примітка: * статистична достовірність ($p \leq 0,05$) по відношенню до негативного контролю за однобічним критерієм Фішера.



Фолікулярна гіперплазія щитоподібної залози. Доза карбендазиму 75 мг/кг, Х400, Г&Е.

Атипова залозиста гіперплазія матки. Доза карбендазиму 5 мг/кг, Х200, Г&Е.

Лейдигоклітинна гіперплазія. Доза карбендазиму 75 мг/кг, Х100, Г&Е.

Рисунок 1 – Пренеопластичні зміни в органах та тканин щурів Wistar.

зистої гіперплазії матки (рис. 1б), у самців – лейдигоклітинну гіперплазію (рис. 1в).

При патологоанатомічному дослідженні тканин загиблих тварин і після евтаназії було виявлено пухлини з локалізацією у щитоподібній залозі (62), молочній залозі (43), гіпофізі (31), сім'яниках (16), наднирниках (10), печінці (8), яєчниках (5), матці (4), легенях (3), мозку (1), гарднеровій залозі (1), стравоході (1), підшлунковій залозі (1), а також пухлини гемопоетичної системи (19), м'яких тканин (7) і шкіри (3) (таблиця 3).

Локалізація та гістоморфологічний спектр виявлених пухлин щурів у проведеному експерименті були характерними для даного виду тварин [23-24], децю змінювалась їх частота. Кількісні показники онкогенного ефекту карбендазиму, отримані у даному експерименті, наведені у таблиці 4.

Збільшення частоти пухлин порівняно з негативним контролем виявлено у щурів які отримували карбендазим у дозах 5 і 25 мг/кг маси тіла: близько в 1,9 рази у самців і 1,6 рази у самиць (p≥0,05).

Таблиця 3 – Локалізація і гістоморфологічний тип пухлин щурів Wistar, виявлених у дослідженні за впливу карбендазиму в умовах хронічного експерименту

Локалізація і гістоструктура пухлин		Частота пухлин (абсолютна і (%)) по відношенню до ефективного числа							
		самці, доза (мг/кг)				самиці, доза (мг/кг)			
		0	5	25	75	0	5	25	75
1.	ГІПОФІЗ	4(8,1)	2 (3,6)	4(6,8)	2(3,7)	3 (5,1)	3(5,0)	3(5)	10 ^{***} (16,9)
	Аденома	3(6,1)	1(1,8)	1(1,7)	1(1,9)	2(3,4)	-	2(3,3)	8 ^{***} (13,5)
	Аденокарцинома	1(2)	1(1,8)	3(5,1)	1(1,9)	1(1,7)	3(5,0)	1(1,7)	2(3,4)
2.	ЩИТОПОДІБНА ЗАЛОЗА	3(6,1)	7(12,7)	6(10,2)	5(9,3)	6(10,2)	14 [*] (23,3)	11(18,3)	10(16,9)
	Фолікулярноклітинна аденома	2(4,1)	4(7,3)	4(6,8)	2(3,7)	3(5,1)	10(16,7)	6(10)	6(10,2)
	Фолікулярноклітинна карцинома	1(2)	3(5,4)	2(3,4)	3(5,6)	3(5,1)	4(6,7)	5(8,3)	4(6,8)
3.	МОЛОЧНА ЗАЛОЗА	1(2)	0	0	0	5(8,5)	13 ^{***} (21,7)	15 ^{***} (25)	9(15,3)
	Аденома	-	-	-	-	-	-	1(1,7)	-
	Внутрішньопроотокова папілома	-	-	-	-	-	-	1(1,7)	-
	Фіброма	-	-	-	-	-	1(1,7)	-	2(3,4)
	Фібroadенома	-	-	-	-	5(8,5)	11(18,3)	12(20)	6 (10,2)
	Внутрішньопроотокова карцинома	-	-	-	-	-	-	-	1(1,7)
4.	ЛЕГЕНІ	0	1(1,8)	0	1(1,9)	0	1(1,7)	0	0
	Бронхоальвеолярна аденома	-	-	-	1(1,9)	-	-	-	-
	Аденокарцинома	-	1(1,8)	-	-	-	1(1,7)	-	-
5.	ПЕЧІНКА	0	3(5,5)	0	1(1,9)	2(3,4)	0	2(3,4)	0
	Холангіома	-	1(1,8)	-	-	-	-	1(1,7)	-
	Гемангіома	-	-	-	1(1,9)	-	-	-	-
	Гепатоцелюлярна аденома	-	1(1,8)	-	-	2(3,4)	-	-	-
	Фібросаркома	-	1(1,8)	-	-	-	-	1(1,7)	-
6.	НАДНИРНИКИ	0	2(3,6)	2(3,4)	1(1,9)	2(3,4)	2(3,3)	0	1(1,7)
	Феохромоцитома	-	-	1(1,7)	-	-	-	-	-
	Кортикальна аденома	-	2(3,6)	-	1(1,9)	-	2(3,3)	-	1(1,7)
	Гангліоневрома	-	-	-	-	1(1,7)	-	-	-
	Карцинома	-	-	1(1,7)	-	1(1,7)	-	-	-

ПАТОМОРФОЛОГІЯ

7.	МАТКА					0	1(1,7)	3(5)	0
	<i>Аденокарцинома</i>					-	1(1,7)	3(5)	-
8.	ЯЄЧНИКИ					1(1,7)	4 (6,7)	0	0
	<i>Фіброма</i>					-	1 (1,7)	-	-
	<i>Цистаденома</i>					-	1 (1,7)	-	-
	<i>Текома</i>					-	1 (1,7)	-	-
	<i>Гранульозоклітинна пухлина</i>					1(1,7)	1 (1,7)	-	-
9.	СІМ'ЯНИКИ	2(4,1)	3(5,5)	9* (15,3)	2(3,7)	-	-	-	-
	<i>Лейдигома</i>								
10.	ГЕМОПОЕТИЧНА СИСТЕМА	1(2,0)	2(3,6)	4(6,8)	0	3(5,1)	4 (6,7)	4(6,7)	1(1,7)
	<i>Тімома</i>	1(2,0)	-	-	-	-	3(5)	-	-
	<i>Лімфосаркома</i>	-	-	1(1,7)	-	1(1,7)	1(1,7)	2(3,3)	1(1,7)
	<i>Ретикулосаркома</i>	-	1(1,8)	3(5,1)	-	1(1,7)	-	2(3,3)	-
	<i>Поліморфноклітинна саркома</i>	-	1(1,8)	-	-	1(1,7)	-	-	-
11.	М'ЯКІ ТКАНИНИ	1(2,0)	2(3,6)	0	0	0	1(1,7)	1(1,7)	2(3,4)
	<i>Ліпома</i>	-	1(1,8)	-	-	-	-	-	-
	<i>Фіброма</i>	1(2)	1(1,8)	-	-	-	1(1,7)	-	-
	<i>Гістіоцитарна саркома</i>	-	-	-	-	-	-	1(1,7)	1(1,7)
	<i>Недиференційована цистсаркома</i>	-	-	-	-	-	-	-	1(1,7)
12.	ШКІРА	0	1(1,8)	0	0	0	1 (1,7)	1(1,7)	0
	<i>Трихоепітеліома</i>	-	1(1,8)	-	-	-	1 (1,7)	-	-
	<i>Базалеома</i>	-	-	-	-	-	-	1(1,7)	-
13.	ІНШЕ	0	1(1,8)	1(1,7)	1(1,9)	1(1,7)	1(1,7)	0	0
	<i>Аденома гарднерової залози</i>	-	-	-	-	-	1	-	-
	<i>Ацинарноклітинна карцинома підшлункової залози</i>	-	1(1,8)	-	-	-	-	-	-
	<i>Гліома</i>	-	-	-	-	1(1,7)	-	-	-
	<i>Плоскоклітинна карцинома стравоходу</i>	-	-	-	1(1,9)	-	-	-	-
	<i>Фібросаркома селезінки</i>	-	-	1(1,7)	-	-	-	-	-

Примітка: * статистична достовірність ($p \leq 0,05$) у порівнянні з негативним контролем з урахуванням загальної кількості тварин; ** статистична достовірність ($p \leq 0,05$) у порівнянні з негативним контролем з урахуванням ефективного числа за однобічним критерієм Фішера. Частота пухлин (%) надана по відношенню до ефективного числа (таблиця 3).

Між частотою злоякісних новоутворень у піддослідних і контрольних тварин достовірної різниці не встановлено. Виявлено один випадок аденокарциноми гіпофізу з метастазами в легені. Коефіцієнт множинності також статистично не відрізнявся у щурів піддослідних і контрольної груп.

Кількість доброякісних пухлин перевищувала кількість злоякісних. Аналіз частоти новоутворень у піддослідних і контрольних щурів в залежності від їх локалізації і гістологічного типу показав статистично достовірне збільшення у самиць частоти пухлин молочної залози у дозі 5 і 25 мг/кг, щитоподібної залози у дозі 5 мг/кг (див. табл. 3 та рис. 2 і 3) і гіпофізу у дозі 75 мг/кг за рахунок доброякісних новоутворень; у самців – лейдигом у дозі 25 мг/кг.

Отже, найбільшу кількість пухлин (171 пухлина, що складає 79 % всіх новоутворень) діагностовано в органах ендокринної і статевої системи. Частота пухлин даної локалізації у самців в залежності від дози становила 9, 12, 6 і 5 % в контролі, у самиць – 21, 19, 18 і 10 % в контролі, відповідно.

Таблиця 4 – Кількісні показники онкогенного ефекту карбендазіму в умовах хронічного надходження в організм щурів Wistar

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Ефективне число	Кількість тварин з пухлинами	Частота пухлин (%) ¹	Кількість пухлин		Коефіцієнт множинності пухлин
					всього	добро-/злоякісні	
самці							
0	60	49	10	20,4	12	9/3	1,2
5	60	55	21	38,2	24	15/9	1,2
25	60	59	22	37,2	26	15/11	1,2
75	60	54	10	18,5	13	7/6	1,3
самиці							
0	60	59	20	32,2	23	13/10	1,2
5	60	60	31	53,3	45*	31/14	1,4
25	60	60	31	51,6	40*	23/17	1,3
75	60	59	28	47,4	33	23/10	1,2

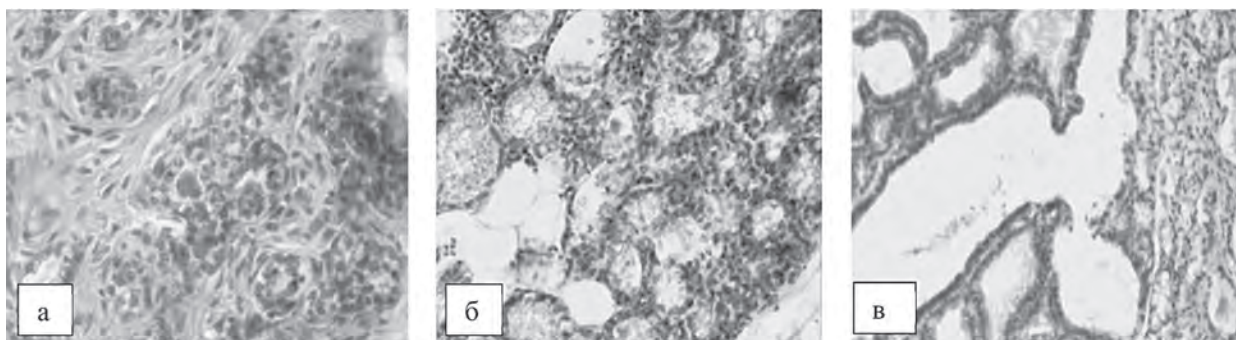
Примітка: * статистична достовірність ($p \leq 0,05$) по відношенню до негативного контролю за χ^2 з поправкою Йейтса; ¹ частота пухлин надана по відношенню до ефективного числа.

Частота інших пухлин була практично співставна в усіх групах і достовірно не відрізнялась від показників контролю.

Оцінка частоти виникнення пухлин показала, що позитивний тренд змін дози і кількості виявлених пухлин [22] у проведеному експерименті є незначущим ($Z=0,03$; $P > 0,4$).

Іншим прямим показником канцерогенного ефекту є латентний період розвитку пухлин. Аналіз отриманих даних свідчить про те, що час виявлення першої пухлини практично збігається у піддослідних і контрольній групах (табл. 5), всі «перші» пухлини у

ПАТОМОРФОЛОГІЯ

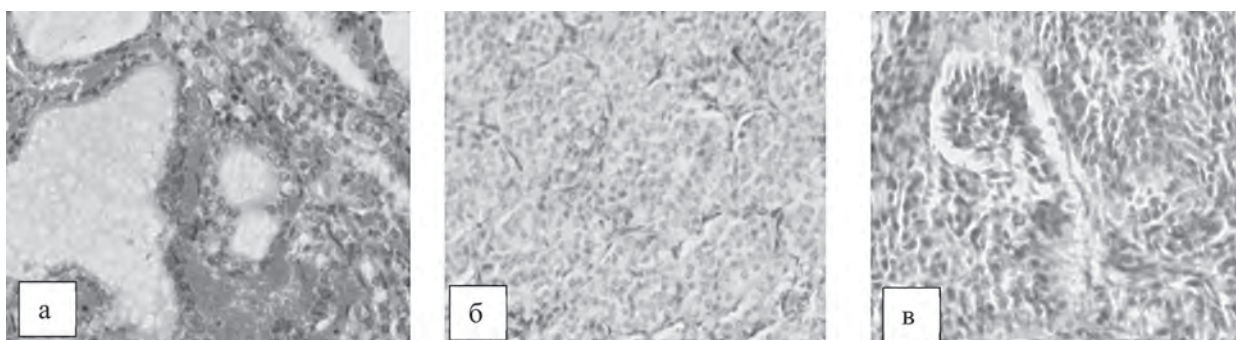


Фіброаденома молочної залози. Доза карбендазиму 5 мг/кг. x200, Г&Е.

Аденома молочної залози. Доза карбендазиму 25 мг/кг. x200, Г&Е.

Внутрішньопотокова папілома. Доза карбендазиму 25 мг/кг. x100, Г&Е.

Рисунок 2 – Пухлини молочної залози щурів Wistar в експерименті.



Поліморфофолікулярна аденома. Доза 5 мг/кг. x200, Г&Е.

Солідна аденома. Доза карбендазиму 5 мг/кг. x200, Г&Е.

Солідна аденокарцинома. Доза 25 мг/кг. x200, Г&Е.

Рисунок 3 – Пухлини щитоподібної залози щурів Wistar в експерименті.

Таблиця 5 – Середня тривалість життя і латентний період пухлин щурів Wistar в експерименті

Доза, мг/кг	Середня тривалість життя тварин (СТЖ), тижні		Середній латентний період пухлин щурів з пухлинами:				Латентний період першої пухлини, тижні
	всіх	з пухлинами	щитоподібна залоза	гіпофіз	молочна залоза	сім'яники	
самці							
0	80,2	96,4*	97	90,2	-	93	74
5	85,7	95,1*	104,8	100	-	105	72
25	90,2	95,1*	96,8	83	-	96,2	64
75	89,5	99,3*	102,8	88	-	105	82
самиці							
0	92,4**	88,7	100	88,6	93	-	45
5	97,1**	101,3	103,1	103,7	100,9	-	84
25	95,7**	100,2	105,0	102,6	101,1	-	53
75	94,7**	97,0	95,5	96,7	97,1	-	66

Примітка: * статистична достовірність ($p \leq 0,05$) між СТЖ всіх щурів в експерименті і тварин з пухлинами; ** статистична достовірність ($p \leq 0,05$) між СТЖ самиць та самців всіх щурів в експерименті за χ^2 з поправкою Йейтса.

самців як за часом появи (18 ± 2 місяці), так і за гістоструктурою (гіпофіз, печінка) типові для спонтанного спектру пухлин.

У самиць цей показник більш варіабельний, що пояснюється можливістю раннього виявлення пухлин молочної залози: дійсно, раніше за інші виявлена перша пухлина у контрольних тварин – через 11 місяців експерименту (315 днів), яка була представлена фіброаденомою молочної залози; «перші» пухлини у самиць піддослідних груп виявлені значно пізніше, отже скорочення латентного періоду не відмічено, оскільки всі пухлини виникли у тварин піддослідних груп пізніше, ніж у контрольній.

Аналіз смертності тварин з пухлинами в залежності від типу пухлин показав, що основну масу новоутворень виявлено під час термінальної евтаназії

(104 тижні), у зв'язку з чим, статистично достовірної різниці тривалості їх латентних періодів відсутня.

Таким чином, отримані дані щодо зростання частоти характерних для спонтанного спектру, переважно гормональнозалежних пухлин разом із відсутністю скорочення їх латентного періоду, свідчать про слабку канцерогенну дію карбендазиму, найвірогідніше, епігенетичного механізму. Слід зауважити, що карбендазим володіє здатністю спричинити анеуплідію, тоді як саме для анеугенів вперше були встановлені чіткі нелінійні дозові відповіді [25], що також певною мірою може пояснювати особливості прояву його канцерогенної дії.

Висновки

1. Надходження карбендазиму у дозах 0, 5, 25 та 75 мг/кг маси тіла в організм щурів Wistar упродовж

104 тижнів спричиняє невисоке, але статистично достовірне збільшення частоти пухлин у самиць молочної і щитоподібної залози, пухлин гіпофізу; у самців лейдигоклітинних пухлин без чіткої залежності від дози: зростання частоти пухлин щитоподібної залози встановлено у дозі 5 мг/кг, молочної залози – у дозі 5 мг/кг і 25 мг/кг, пухлин гіпофізу – у дозі 75 мг/кг; лейдигоклітинних пухлин – у дозі 25 мг/кг.

2. Якісних відмінностей гістоморфологічного спектру пухлин у тварин, які отримували карбендазім, не виявлено. Не виявлено також специфічних новоутворень, що не є характерними для щурів Wistar.

3. Встановлено відсутність статистично достовірної різниці між частотою злоякісних пухлин, діагностованих у піддослідних і контрольних тварин, коефіцієнтом множинності, часом виявлення першої пухлини та латентним періодом розвитку пухлин.

4. Отримані кількісні показники зростання частоти характерних для спонтанного спектру, переважно гормональнозалежних пухлин, разом з відсутністю скорочення їх латентного періоду свідчать про слабку канцерогенну дію карбендазіму, найвірогідніше, епігенетичного механізму.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження канцерогенних властивостей карбендазіму в умовах хронічного експерименту на щурах Wistar виявили зростання частоти пухлин органів ендокринної та статевої системи без чіткої залежності «доза-ефект» та без скорочення латентного періоду, що трактується як слабка дія та потребує подальших досліджень, спрямованих на з'ясування можливих механізмів реалізації ефекту.

Література

1. Madia F, Worth A, Whelan M, Corvi R. Carcinogenicity assessment: Addressing the challenges of cancer and chemicals in the environment: Review article. *Environment International*. 2019;128:417-29. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.067>
2. Kara M, Jannuzzi AT, Yön S. In-Vitro Investigation of the Cytotoxic and Genotoxic Effects of Benzimidazole Group Pesticides Benomyl and Carbendazim. *J Toxicol Cur Res*. 2019;3:007. DOI: 10.24966/TCR-3735/100007
3. Vela-Corcia D, Romero D, de Vicente A, Pérez-García A. Analysis of β -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance. *Sci Rep*. 2018;8:7161. DOI: 10.1038/s41598-018-25336-5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5940828/>
4. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. *EFSA Journal*. 2010;8(5):1598. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1598>
5. Lu S-Y. Androgen Receptor Plays a Vital Role in Benomyl- or Carbendazim-Induced Reproductive and Developmental Toxicity and Endocrine-Disrupting Activity in Rats. In book: *Endocrine Disruptors*. Editor Ahmed RG, IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.78276. Available from: <https://www.intechopen.com/books/endocrine-disruptors/androgen-receptor-plays-a-vital-role-in-benomyl-or-carbendazim-induced-reproductive-and-development>
6. Sakr SA, Shalaby SY. Carbendazim-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats: ameliorative effect of licorice aqueous extract. *Toxicol Ind Health*. 2014;30:259-67. Available from: <https://doi.org/10.1177/0748233712456059>
7. Rama EM, Bortolan S, Vieira ML, Gerardin DC, Moreira EG. Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2014;69(3):476-86. DOI: 10.1016/j.yrtph.2014.05.016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24863245>
8. Kolianchuk Y. Izuchenie gonado- i reproductivnoy toksichnosti karbendazima tehnikeskogo na samtsah i samkah krysa Wistar Han. *Ukrainskiy jurnal suchasnyh problem toxicologii*. 2018;4(84):36-41. Dostupno: <http://protok.medved.kiev.ua/index.php/ua/issues/2018/4> [in Russian].
9. Zhou J, Xiong K, Yang Y, Ye X, Liu J, Li F. Deleterious effects of benomyl and carbendazim on human placental trophoblast cells. *Reprod Toxicol*. 2015;51:64-71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530041>
10. US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs. *Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential Annual Cancer Report 2018*. 2018;40. Available from: http://npic.orst.edu/chemicals_evaluated.pdf
11. Silva RC, Barros KA, Pavao AC. Carcinogenicity of carbendazim and its metabolites. *Química Nova [Internet]*. 2014;37(8):1329-34. Available from: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140214>
12. Goyal K, Sharma A, Arya R, Sharma R, Gupta GK, Sharma AK. Double Edge Sword Behavior of Carbendazim: A Potent Fungicide With Anticancer Therapeutic Properties. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018;18(1):38-45. DOI: 10.2174/1871520616666161221113623
13. Kumar A, Banerjee S, Roy P, Sondhi SM, Sharma A. Solvent-free synthesis and anticancer activity evaluation of benzimidazole and perimidine derivatives. *Mol Divers*. 2018;22(1):113-27. DOI: 10.1007/s11030-017-9790-3
14. Yenjerla M, Cox C, Wilson L, Jordan MA. Carbendazim inhibits cancer cell proliferation by suppressing microtubule dynamics. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328(2):390-8. DOI: 10.1124/jpet.108.143537
15. EU Pesticides database. Active substance carbendazim. Available from: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>
16. List of banned pesticides and pesticides watchlist. Version 1.0 2015. Available from: https://utz.org/wp-content/uploads/2015/12/EN_UTZ_List-of-Banned-Pesticides-Watchlist_v1.0_2015.pdf
17. Perelik pestytsydiv i agrohimiaktiv, dozvolenyh do vykorystannia v Ukraini, ofitsiynе vydannia. Kyiv: Univest Media; 2018. 1040 s. [in Ukrainian].
18. Lisovska VS, Nedopytanska NM, Reshavka OV, Tereshchenko NV, Bagliy EA. Identifikatsia kantserogenosti karbendazimu: eksperimentalne doslidjennia na myshah linii CBA. *Ukrainskiy jurnal suchasnyh problem toxicologii*. 2019;3(87):18-23. [in Ukrainian].
19. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumors of the Rat. Second Edition. Edited by Turusov V. and Mohr U. IARC Scientific Publications. 1991;99:766.
20. Plohinskiy NA. *Biometria*. Moskva: Izdatelstvo Moskovskogo gosudarstvennogo universiteta; 1970. 352 s. [in Russian].
21. Turusov VS, Parfionov YD. *Metody vyavlenia i reglamentirovania himicheskikh kantserogenov*. Moskva: Meditsina; 1986. 125 s. [in Russian].
22. Peto R, Pike NE, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S, et al. Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in longterm animal experiments. In IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to human. 1980;2:311-426.
23. Weber K. Differences in Types and Incidence of Neoplasms in Wistar Han and Sprague-Dawley Rats. *Toxicologic Pathology*. 2017;45(1):64-75. DOI: 10.1177/0192623316672075.
24. Hojo M, Sakamoto Y, Maeno A, Tayama K, Tada Y, Yuzawa K, et al. A histopathological analysis of spontaneous neoplastic and non-neoplastic lesions in aged male RccHan: WIST rats. *Technical Report. Journal of Toxicologic Pathology*. 2020;33(1):47-55. DOI: 10.1293/tox.2019-0064
25. Hernández LG, van Benthem J, Johnson GE. A Mode-of-Action Approach for the Identification of Genotoxic Carcinogens. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e64532. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064532>. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064532>

КАНЦЕРОГЕННІСТЬ КАРБЕНДАЗИМУ: ДОСЛІДЖЕННЯ У ХРОНІЧНОМУ ЕКСПЕРИМЕНТІ НА ЩУРАХ WISTAR Лісовська В. С., Недопитанська Н. М., Решавська О. В., Баглий Є. А.

Резюме. Досліджено канцерогенні властивості карбендазиму технічного 98 % на щурах Wistar самців і самиць в умовах хронічного 24-місячного експерименту в дозах 5, 25 і 75 мг/кг маси тіла при внутрішньошлунковому введенні за допомогою атравматичного металевого зонду. Встановлено невисоке, але статистично значиме зростання частоти пухлин, характерних для спонтанного спектру: у самиць – молочної та щитоподібної залози, пухлин гіпофізу, у самців – лейдигоклітинних пухлин без чіткої залежності від дози: зростання частоти пухлин щитоподібної залози встановлено у дозі 5 мг/кг, молочної залози – у дозі 5 мг/кг і 25 мг/кг, пухлин гіпофізу – у дозі 75 мг/кг; лейдигоклітинних пухлин – у дозі 25 мг/кг. Зростання частоти характерних для щурів, переважно гормональнозалежних пухлин, разом з відсутністю скорочення їх латентного періоду і нечіткої залежності «доза-ефект» свідчать про слабку канцерогенну дію карбендазиму, найвірогідніше, епігенетичного механізму, що потребує подальших досліджень.

Ключові слова: карбендазим, канцерогенез, пухлини, щури Wistar.

КАНЦЕРОГЕННОСТЬ КАРБЕНДАЗИМА: ИССЛЕДОВАНИЕ В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРЫСАХ WISTAR

Лисовская В. С., Недопитанская Н. Н., Решавская Е. В., Баглей Е. А.

Резюме. Изучены канцерогенные свойства карбендазима технического 98 % на крысах Wistar, самцах и самках в условиях хронического 24-месячного эксперимента при введении зондом в желудок в дозах 5, 25 и 75 мг/кг массы тела. Установлено небольшое, но статистически достоверное увеличение частоты опухолей, характерных для спонтанного спектра: у самок – молочной и щитовидной желез, опухолей гипофиза, у самцов – лейдигом без четкой зависимости от дозы: рост частоты опухолей щитовидной железы выявлен в дозе 5 мг/кг, молочной железы – в дозе 5 мг/кг и 25 мг/кг, опухолей гипофиза – в дозе 75 мг/кг, лейдигом – в дозе 25 мг/кг. Увеличение частоты характерных для крыс, преимущественное гормональнозависимых опухолей, при отсутствии сокращения их латентного периода и нечеткой зависимости от дозы свидетельствует о слабом канцерогенном действии карбендазима, вероятнее всего, эпигенетического механизма, что требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: карбендазим, канцерогенез, опухоли, крысы Wistar.

CARBENDASIM CARCINOGENICITY: AN EXPERIMENTAL TWO-YEAR STUDY IN WISTAR RATS

Lisovska V. S., Nedopytanska N. M., Reshavska O. V., Bagliy Y. A.

Abstract. Objective. Carbendazim is one of the widely used benzimidazole fungicides. Its mechanism of action is to inhibit polymerization of microtubules of the mitotic spindle in fungal cells and damage the cell division. A similar effect on mammalian and human cells is not ruled out. Well known reproductive and developmental toxicity of carbendazim, but the question of its carcinogenicity has not yet been clarified. Carbendazim cause liver tumours in mice and classified by EPA (1989) as “possible human carcinogen” and not classified in one of the carcinogenicity categories in EC. In Ukraine are 27 registered fungicides containing the active ingredient carbendazim, mainly generic, so the question of its carcinogenicity is still relevant.

Object and methods. In our study, the carcinogenic effect of carbendazim technical 98 % were investigated by chronic 24-month experiment in Wistar rats. Male and female rats aged between 1.5 and 2.0 months were assigned randomly to experimental and control groups, each group consisted of 70 rats of each sex. Rats receiving carbendazim at a dose of 5, 25, or 75 mg/kg body weight by gavage. All rats were observed daily for general physical condition and weekly were recorded body weights and the palpable neoplasms. Died and sacrificed (in according to study plan) animals have been necropsied and tissue samples were collected for histopathology. Statistically was evaluated such direct indicators of carcinogenic effect as the tumor rate, latent period and survival of animals with tumors.

Results. According to the obtained results in our study, benign neoplasms prevailed among tumors in all groups and were usual occurring neoplasm, characteristic to Wistar rats. The incidence of malignant neoplasia across the treatment and control groups was similar. Treatment-related tumours included neoplasms of mammary gland, thyroid gland and pituitary in females and testis tumours in male without clear dose dependence. There was low but significant increased tumours of thyroid gland in the 5 mg/kg female group, mammary gland in the 5 and 25 mg/kg groups, pituitary in the 75 mg/kg and leydig cells tumours in the 25 mg/kg male group.

Thus, the most frequently tumors were in the organs of the endocrine and reproductive system. The tumor rate of this localization in males was 9 %, 12 %, 6 % in minimal, middle and high dose opposite 5 % in the control, and in females – 21 %, 19 %, 18 % and 10 %, respectively.

Conclusion. Under the conditions of 2-year studies, there was evidence of carcinogenic activity of carbendazim in rats based on increased incidences of hormone-dependent tumors without clear dose dependence and reduction of their latent period. Thus, the obtained data indicate a weak carcinogenic effect of carbendazim, most likely, an epigenetic mechanism. Non-linear dose reactions have been clearly established for aneunogens, which also does not exclude the way the oncogenic effect is realized.

Key words: carbendazim, carcinogenesis, tumors, Wistar rats.

Рецензент – проф. Старченко І. І.
Стаття надійшла 25.02.2020 року